

PARTNERSHIP COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 26 January 2001 (26.01.01) | From the INTERNATIONAL BUREAU To: KITAGAWA, Osamu Kitagawa Patent Law Firm Third Floor Fujigaoka No.2 Asahi Building 7, Fujimigaoka, Meito-ku Nagoya-shi, Aichi 465-0048 JAPON |
| Applicant's or agent's file reference IPOK00-010WO | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP00/03932 | International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00) |

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

| | | |
|---|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address 1) TAKEUCHI, Ken-ichi 2) KOIDE, Yoshinao 3) HIROSE, Yoshihiko Amano Pharmaceutical Co., Ltd. Chuo Kenkyusho 51, Nishi Shiroyashiki Oaza Kunotsubo Nishiharu-cho, Nishi Kasugai-gun Aichi 481-0041 Japan | State of Nationality JP | State of Residence JP |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

| | | |
|---|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address Amano Enzyme Inc. Gifu R & D Center 4-179-35, Sue-cho Kakamigahara-shi Gifu 509-0108 Japan | State of Nationality JP | State of Residence JP |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office | <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority | <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned |
| <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority | <input type="checkbox"/> other: |

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Masashi HONDA |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 26 January 2001 (26.01.01) | To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office |
| International application No. PCT/JP00/03932 | Applicant's or agent's file reference IPOK00-010WO |
| International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00) | Priority date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) |
| Applicant TAKEUCHI, Ken-ichi et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
28 December 2000 (28.12.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Masashi HONDA |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

THIS PAGE BLANK

THIS PAGE BLANK

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KITAGAWA, Osamu
 Kitagawa Patent Law Firm
 Third Floor
 Fujigaoka No.2 Asahi Building
 7, Fujimigaoka, Meito-ku
 Nagoya-shi, Aichi 465-0048
 JAPON

| | | | |
|--|---|---|--|
| Date of mailing (day/month/year) 16 October 2000 (16.10.00) | | | |
| Applicant's or agent's file reference IPOK00-010WO | IMPORTANT NOTIFICATION | | |
| International application No. PCT/JP00/03932 | International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00) | | |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) | | |
| Applicant AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al | | | |
| <p>1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).</p> <p>2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.</p> <p>3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p> <p>4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p> | | | |
| <u>Priority date</u> 17 June 1999 (17.06.99) | <u>Priority application No.</u> 11/170555 | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> JP | <u>Date of receipt of priority document</u> 04 Augu 2000 (04.08.00) |

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.36 | Authorized officer Tessade PAMPLIEGA <i>tpp</i> Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KITAGAWA, Osamu
Kitagawa Patent Law Firm
Third Floor
Fujigaoka No.2 Asahi Building
7, Fujimigaoka, Meito-ku
Nagoya-shi, Aichi 465-0048
JAPON

| |
|---|
| Date of mailing (day/month/year) 28 December 2000 (28.12.00) |
| Applicant's or agent's file reference IPOK00-010WO |

IMPORTANT NOTICE

| | | |
|---|---|---|
| International application No. PCT/JP00/03932 | International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00) | Priority date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) |
| Applicant AMANO ENZYME INC. et al | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CN,EP,IN

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 28 December 2000 (28.12.00) under No. WO 00/78926

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, ch min des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Faxsimile No. (41-22) 740.14.35

Form PCT/IB/308 (July 1996)

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2000年12月28日 (28.12.2000)

PCT

(10)国際公開番号
WO 00/78926 A1

- (51)国際特許分類: C12N 1/21, 15/52, 9/80
- (21)国際出願番号: PCT/JP00/03932
- (22)国際出願日: 2000年6月15日 (15.06.2000)
- (25)国際出願の言語: 日本語
- (26)国際公開の言語: 日本語
- (30)優先権データ:
特願平11/170555 1999年6月17日 (17.06.1999) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒460-8630 愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 Aichi (JP).
- (72)発明者; および
- (75)発明者/出願人(米国についてのみ): 竹内賢一 (TAKEUCHI, Ken-ichi) [JP/JP]. 小出芳直 (KOIDE, Yoshinao) [JP/JP]. 広瀬芳彦 (HIROSE, Yoshihiko) [JP/JP]
- [JP/JP]; 〒481-0041 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷51 天野製薬株式会社 中央研究所内 Aichi (JP). 森口充勝 (MORIGUCHI, Mitsuaki) [JP/JP]; 〒870-1124 大分県大分市大字旦野原700番地 Oita (JP). 磯部公安 (ISOBE, Kimiyasu) [JP/JP]; 〒020-0111 岩手県盛岡市黒石野3丁目15の40 Iwate (JP).
- (74)代理人: 弁理士 北川 治 (KITAGAWA, Osamu); 〒465-0048 愛知県名古屋市名東区藤見が丘7番地 藤ヶ丘第2朝日ビル3階 北川国際特許事務所 Aichi (JP).
- (81)指定国(国内): CN, IN, US.
- (84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: TRANSFORMED MICROORGANISM AND PROCESS FOR PRODUCING D-AMINOACYLASE

(54)発明の名称: 形質転換微生物、D-アミノアシラーゼの製造方法

(57) Abstract: A transformed microorganism which selectively produces D-aminoacylase alone between D-aminoacylase and L-aminoacylase, obtained by transferring a D-aminoacylase production gene into a host microorganism tolerant to zinc; and a process which comprises culturing the above transformed microorganism in a medium containing zinc ion and obtaining D-aminoacylase from the culture medium at a high efficiency.

(57)要約:

D-アミノアシラーゼ及びL-アミノアシラーゼの内D-アミノアシラーゼのみを選択的に产生するD-アミノアシラーゼ产生遺伝子を亜鉛耐性を示す宿主微生物に導入してなる形質転換微生物。この形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物からD-アミノアシラーゼを高効率に取得する方法。

WO 00/78926 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書

発明の名称 形質転換微生物、D-アミノアシラーゼの製造方法

技術分野

本発明は、D-アミノアシラーゼ及びL-アミノアシラーゼのうち、D-アミノアシラーゼのみを選択的に生産させるD-アミノアシラーゼ产生遺伝子を亜鉛耐性微生物に導入してなる形質転換微生物、及び該形質転換微生物を利用したD-アミノアシラーゼの製造方法に関する。

背景技術

D-アミノアシラーゼは、抗生素質の側鎖やペプチド医薬品等の用途に求められる光学的純度の高いD-アミノ酸の製造等のために産業上有用な酵素である。

従来、D-アミノアシラーゼとL-アミノアシラーゼを同時に生産する微生物として、ケミカル・アンド・ファルマシューティカル・ブリテン（Chemical and Pharmaceutical Bulletin）26, 2698(1978)にはシードモナス・エスピー（*Pseudomonas* sp.）AAA6029 株が開示されている。又、特開昭53-59092号公報には、ストレプトミセス・オリバセウス（*Streptomyces olivaceus*）S-62等の放線菌が開示されている。これらの微生物を利用した場合、D-アミノアシラーゼの生産能力はさておき、光学異性体であるD-アミノアシラーゼとL-アミノアシラーゼとを同時に生産してしまうため、両者を分離すると言う煩雑で高コストな操作を余儀無くされる欠点がある。

一方、D-アミノアシラーゼのみを選択的に生産する微生物として、例えば特開平1-5488号公報には、アルカリゲネス・デニトリフィカンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス（*Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*）MI-4 株が開示されている。この菌株を利用した場合、D-アミノアシラーゼとL-アミノアシラーゼの分離と言う面倒がないものの、

D-アミノアシラーゼの生産能力が不十分であった。しかも特開平1-5488号公報では、D-アミノアシラーゼ产生遺伝子の塩基配列が解明されていなかったため、D-アミノアシラーゼの生産能力を向上させるための遺伝子の改変、高生産性の形質転換微生物の創製等を図ることができなかつた。

以上の点に鑑み、本願発明者である森口らは、アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans*) A-6株が有するD-アミノアシラーゼ产生遺伝子の構造を解明し、配列表の配列番号1に係る塩基配列を示した。さらに、このD-アミノアシラーゼ产生遺伝子に一定の改変を加えることにより、形質転換微生物のD-アミノアシラーゼ生産能力を顕著に向上させることに成功した (Protein Expression and Purification 7, 395-399 (1996))。

発明の開示

その後の研究により、上記D-アミノアシラーゼ产生遺伝子を導入した各種の形質転換微生物は、亜鉛イオンを含む培地においてD-アミノアシラーゼ生産能力が大きく向上することが分かつた。特に、その亜鉛イオン濃度を一定の範囲に制御すると生産能力の向上が著しいことも分かつた。

更に上記の効果は宿主微生物の種類によって度合いが大きく異なり、効果の大きい宿主微生物は、一般的に形質転換前においても亜鉛耐性を示すことが分かつた。この亜鉛耐性とは、菌体量 (A_{660 nm}) を以て測定される繁殖能力が亜鉛イオン添加によって阻害され難いことを言う。

上記の知見から、次の①、②の事項を指摘できる。即ち、①配列表の配列番号1に示すD-アミノアシラーゼ产生遺伝子を持つ形質転換微生物は、理由は明確ではないが、一定量の亜鉛イオンの存在により発現が増強される。②亜鉛イオンは通常の微生物に対して阻害的に働くと考えられることから、亜鉛イオンの効果を充分に確保するためには、元々亜鉛耐性を備えた微生物を、遺伝子導入の宿主として選択する必要がある。

以上の点に基づき、本発明は、D-アミノアシラーゼ产生遺伝子を用いて形質転換された微生物であつて、培地への亜鉛イオンの添加により、D-アミ

ノアシラーゼ生産能力が更に大きく増強され得るものを見出す。又、本発明は、上記の形質転換微生物を利用したD-アミノアシラーゼの製造方法を提供する。

本発明の形質転換微生物は、亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を亜鉛耐性を示す宿主微生物に導入し、亜鉛イオンを含む培地におけるD-アミノアシラーゼ高生産性形質を獲得させた微生物である。この形質転換微生物は、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子で形質転換された微生物であって、培地への亜鉛イオンの添加によりD-アミノアシラーゼ生産能力が最大限に増強され得る。

本発明の形質転換微生物において、より好ましくは、上記D-アミノアシラーゼ産生遺伝子が配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するか、又は配列表の配列番号1に示す塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすると共にD-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有する。配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するD-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、亜鉛イオンの存在により著しく遺伝子産物の発現が増強される遺伝子であることが確認されている。又、配列表の配列番号1に示す塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすると共にD-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものも、同様の特徴を期待できる。

本発明の形質転換微生物において、更に好ましくは、宿主微生物が大腸菌である。大腸菌は亜鉛耐性を備えることが確認された。又、大腸菌はその菌学的性質や生理的性質、培養条件や管理条件等が周知されている。従って、D-アミノアシラーゼの高効率生産を、容易な生産管理の下に行える。

本発明の形質転換微生物において、更に好ましくは、宿主微生物へ導入されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子に対して、次の(1)及び/又は(2)の改変を行う。(1)リボソーム結合領域に特定塩基配列(G A A G G A)を設計して、遺伝子の翻訳開始点上流9塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。この改変により、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の翻訳効率が向上する。(2)大腸菌のHind III認識部位を遺伝子の上流と

下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより、遺伝子の発現効率の向上を図る改変。この改変により、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の発現効率が向上する。

本発明に係る形質転換微生物を得るための宿主微生物としては、亜鉛耐性の微生物が用いられる。より具体的に言えば、菌体量 (A_{660 nm}) の増加又は減少を以て測定される培地中の繁殖能力が、亜鉛イオン添加によって余り阻害されない微生物が用いられる。亜鉛耐性の一つの判断基準として、当該微生物の亜鉛無添加培地における菌体量 (A_{660 nm}) に対して、亜鉛 2 mM 添加の同一条件培地における菌体量が増加又は 10% 以内の減少にとどまること、が挙げられる。あるいは、亜鉛 5 mM 添加の同一条件培地における上記菌体量が増加又は 20% 以内の減少にとどまること、が挙げられる。

宿主微生物の分類上の種類は限定されないが、一般的には、形態学的性質や生理学的性質が良く知られ、その培養条件や管理条件が周知である宿主微生物が好ましい。かかる宿主微生物の好適例として、大腸菌 (*Escherichia coli*) を挙げることができる。反面、前記 A-6 株を含むアルカリゲネス・キシロースオキシダンス種の微生物は、大腸菌と比較すると亜鉛耐性を備えていない。

宿主微生物に対する D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の導入手段は特段に限定されず、例えば、プラスミドに連結して導入する方法や、バクテリオファージ DNA に連結して導入する方法等を必要に応じて任意に選択すれば良い。

本発明に係る D-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、D-アミノアシラーゼ及び L-アミノアシラーゼのうち D-アミノアシラーゼのみを選択的に生産させる遺伝子であって、培地中の亜鉛イオンの存在によりその活性発現が増強されるタイプのものである。このような D-アミノアシラーゼ産生遺伝子であることが確認された好適な一例として、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有するものを挙げができる。又、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすると共に、D-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものも好適であるが、実際に培地中の亜鉛イオンにより活性発現が増強されないものは除かれる。

配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する D-アミノアシラーゼ産生遺

伝子は、前記アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンスA-6株から取得された。このA-6株は、自然界の土壤よりスクリーニングによって得られたD-アミノアシラーゼ產生菌である。

本発明のD-アミノアシラーゼの製造方法は、上記したいずれかの形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物からD-アミノアシラーゼを取得する方法である。亜鉛イオンは、例えば塩化亜鉛、硫酸亜鉛等の亜鉛化合物を培地に適量添加することにより与えることができる。この方法により、D-アミノアシラーゼを高効率に製造することができる。

本発明のD-アミノアシラーゼの製造方法において、より好ましくは、上記培地に含まれる亜鉛イオン濃度を0.1~10mMに制御する。この方法により、培地中の亜鉛イオン濃度が最適化され、D-アミノアシラーゼをとりわけ高効率に製造することができる。

D-アミノアシラーゼの製造方法に関し、上記以外の点の実施方法や実施条件は特段に限定されないが、tacプロモーターの誘導物質（例えば、イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）、ラクトース等）を誘導物質とする栄養培地中で培養を行うことが好ましい。更にその際のラクトース濃度を0.1~1%程度としておくこと等も好ましい。

図面の簡単な説明

第1図はD-アミノアシラーゼ產生遺伝子を連結するために用いたプラスミドを概念化して示す図である。第2図はD-アミノアシラーゼ產生遺伝子を連結したプラスミドを概念化して示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施するための最良の形態を比較例と共に説明する。本発明は、これらの実施の形態に限定されるものではない。

(遺伝子の取得と塩基配列の決定)

アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロ-

スオキシダンスA-6株から得た染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解し、2~9KbのDNA断片を分取した。得られたDNA断片を公知のプラスミドpUC118のBamHI認識部位に挿入連結した。この連結プラスミドにより大腸菌JM109を形質転換し、アンピシリン耐性形質転換株を得た。こうして得られた形質転換株の中から、D-アミノアシラーゼのみを選択的に生産する能力を持つ株を得た。この能力を持つ形質転換株は、5.8Kbの挿入断片を持つプラスミドを保持していた。

上記プラスミド中の5.8Kbの挿入断片をトリムダウンして、D-アミノアシラーゼ產生遺伝子の位置を推定した。そして、約2.0KbのDNAについて、常法に従い、配列表の配列番号1に示すような塩基配列を決定した。配列表には、対応するアミノ酸配列も付記する。その結果、ATGから始まる1452ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレーム(ORF)を確認した。

(遺伝子の改変)

上記の5.8Kbの挿入断片を持つプラスミドから、BamHI-HindIII消化により4KbのDNA断片を切り出し、公知のプラスミドpUC118と連結することにより連結プラスミドpAND118を作製し、これを鑄型として、プライマーを用いた部分特異的変異により、リボソームバインディングサイト(RBS)を改変したプラスミドpANSD1を作製した。

次に、上記プラスミドpANSD1を鑄型とし、プライマーを用いた部分特異的変異により、上記RBSの直上流にはEcoRIの認識部位を、又、ORFの直下流にはHindIII認識部位を、それぞれ作成してなるプラスミドpANSD1HEを得た。

更にプラスミドpANSD1HEを制限酵素EcoRI-HindIIIで消化して得た1.8KbのDNA断片を、図1に示すプラスミドpKK223-3のEcoRI-HindIII部位に挿入連結して、図2に示すプラスミドpKNSD2を得た。

(形質転換大腸菌)

大腸菌(Escherichia coli)K12株由来の株を宿主として、D. HANA HANの方法(DNA cloning Vol.1 109~136 1985)によりプラスミドDNAを

導入し、形質転換大腸菌 *E. coli* TG1/pKNSD2を得た。

(遺伝子取得源菌株の亜鉛耐性)

前記のアルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンスA-6株を、リン酸一カリウム0.2%，リン酸二カリウム0.2%，ポリペプトン2%，硫酸マグネシウム0.01%及びグリセリン1%を含み、pH 7.2である亜鉛無添加培地、及びこれと同一組成の培地にそれぞれ0.2mM, 2.0mM及び5.0mMの濃度に酸化亜鉛を添加した亜鉛添加培地において30°C、24時間培養した。培養後、菌体量(A60nm)を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その際、培養後の培地pHも測定した。その結果を表1における「A-6菌」と表記した欄に示す。

【表1】

| 菌の種類 | 亜鉛濃度 (mM) | 培養後pH | 菌体量 (A660) | 相対値 (%) |
|----------------------|-----------|-------|------------|---------|
| A-6菌 | 0.0 | 7.58 | 8.09 | 100.0 |
| | 0.2 | 7.62 | 7.75 | 95.8 |
| | 2.0 | 7.56 | 5.23 | 64.6 |
| | 5.0 | 7.68 | 3.34 | 41.3 |
| TG1 (宿主菌) | 0.0 | 5.01 | 5.68 | 100.0 |
| | 0.2 | 4.99 | 5.93 | 104.4 |
| | 2.0 | 4.98 | 5.55 | 97.7 |
| | 5.0 | 5.01 | 4.98 | 87.7 |
| pKNSD2/TG1 (組換え菌) | 0.0 | 5.00 | 6.45 | 100.0 |
| | 0.2 | 5.01 | 6.70 | 103.9 |
| | 2.0 | 4.98 | 6.09 | 94.4 |
| | 5.0 | 5.01 | 5.47 | 84.8 |

表1より、亜鉛無添加培地におけるA-6株の菌体量に対して、亜鉛添加培地におけるA-6株の菌体量は顕著に減少しており(2.0mMの亜鉛添加培地において約35%、5.0mMの亜鉛添加培地において約60%の減少)、上記A-6株が亜鉛耐性ではないことが分かる。

(宿主菌の亜鉛耐性)

宿主菌として用いた上記大腸菌K12株由来の株に対しても、上記のA-6株と同様の組成の培地を用いて、同様に菌体量 (A660nm) を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その結果を表1における「TG1(宿主菌)」と表記した欄に示す。

表1より、亜鉛無添加培地における宿主菌の菌体量に対して、亜鉛添加培地における宿主菌の菌体量は余り減少せず (2.0mMの亜鉛添加培地において約3%、5.0mMの亜鉛添加培地において約12%の減少。0.2mMの亜鉛添加培地においては却って増加している)、上記宿主菌が亜鉛耐性であることが分かる。

(形質転換大腸菌の亜鉛耐性)

形質転換大腸菌 E. coli TG1/pKNSD2に対しても、上記のA-6株と同様の組成の培地を用いて、同様に菌体量 (A660nm) を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その結果を表1における「pKNSD2/TG1(組換え菌)」と表記した欄に示す。

表1より、亜鉛無添加培地における形質転換大腸菌の菌体量に対して、亜鉛添加培地における形質転換大腸菌の菌体量は余り減少せず (2.0mMの亜鉛添加培地において約5%、5.0mMの亜鉛添加培地において約15%の減少。0.2mMの亜鉛添加培地においては却って増加している)、上記形質転換大腸菌が亜鉛耐性であることが分かる。

(形質転換大腸菌に対する亜鉛添加効果)

形質転換大腸菌 E. coli TG1/pKNSD2を、バクトリップトン1%、バクトイーストエキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%及びアンピシリン100μg/mlを含むpH7.0の培地において30°Cで16時間の前培養を行った。

続いて、前培養後の形質転換大腸菌を、リン酸一カリウム0.2%、リン酸二カリウム0.2%、ポリペプトン2%、硫酸マグネシウム0.01%、グリセリン1%及び誘導剤としてのラクトース0.1%を含み、pH7.0である亜鉛無添加培地、及びこれと同一組成の培地にそれぞれ0.2mM及び2.0mMの濃度に酸化亜鉛を添加した培地において、30°Cで24時間の

本培養を行った。又、培養液のプロスアウト pH と、培養液 (A 660 nm) D-アミノアシラーゼ酵素活性 (U/mL) を測定した。

その結果、亜鉛無添加培地では酵素活性が 21.78 U/mL (プロスアウト pH 5.05) であったのに対して、0.2 mM の亜鉛添加培地においては 58.85 U/mL (プロスアウト pH 5.03)、2.0 mM の亜鉛添加培地においては 109.79 U/mL (プロスアウト pH 5.11) の酵素活性を示した。従って、少なくとも一定の濃度範囲における亜鉛イオンの添加によって、D-アミノアシラーゼ生産能力が顕著に向上了することを確認した。

又、比較のために、前記 A-6 株を上記の前培養用の培地（但しアンピシリンは無添加）において同上の条件で前培養し、更に、誘導剤を上記ラクトース 0.1% から N-アセチル-D, L-ロイシン 0.1% に変更した以外は上記の本培養用の培地と同じ組成の培地において同上の条件で本培養を行った。そして、培養液のプロスアウト pH と、培養液 (A 660 nm) D-アミノアシラーゼ酵素活性 (U/mL) を測定した。

その結果、亜鉛無添加培地では酵素活性が 0.29 U/mL (プロスアウト pH 7.47) であったのに対して、0.2 mM の亜鉛添加培地においては 0.12 U/mL (プロスアウト pH 7.48)、2.0 mM の亜鉛添加培地においては 0.29 U/mL (プロスアウト pH 7.43) の酵素活性を示した。従って、亜鉛イオンの添加による D-アミノアシラーゼ生産能力の向上効果を認めることができなかった。

産業上の利用可能性

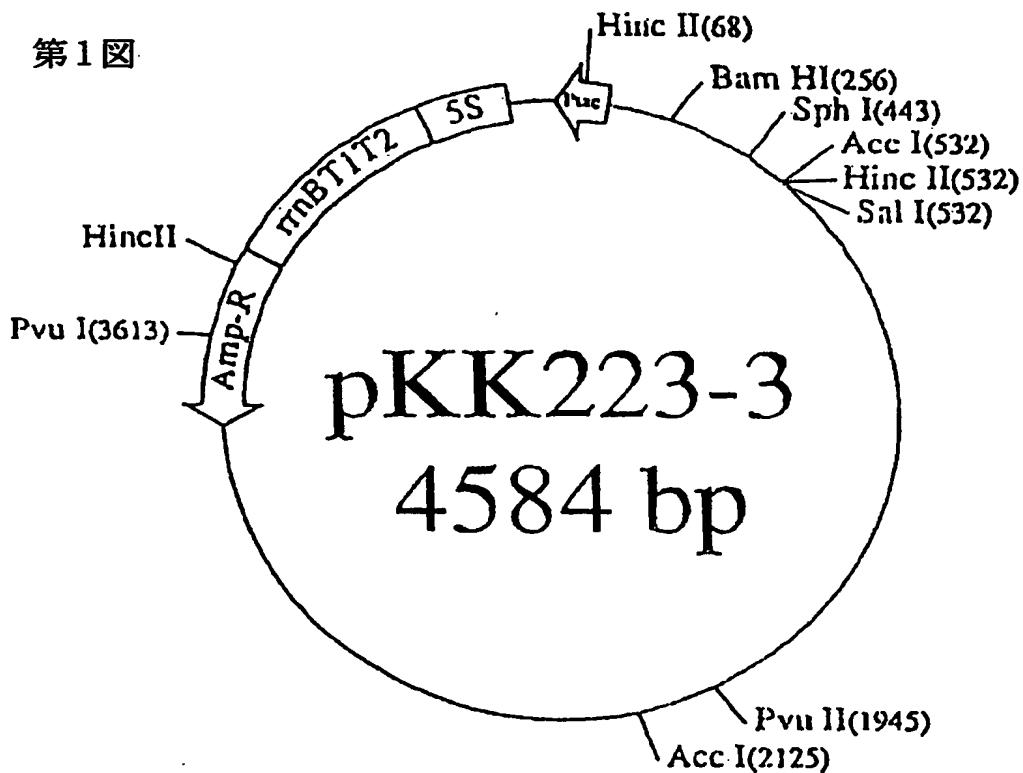
以上のように、本発明の形質転換微生物を用いることによって、産業上有用な酵素である D-アミノアシラーゼを選択的に、かつ高効率に生産することができる。

請 求 の 範 囲

1. 亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を亜鉛耐性を示す宿主微生物に導入し、亜鉛イオンを含む培地におけるD-アミノアシラーゼ高生産性形質を獲得させた形質転換微生物。
2. 前記D-アミノアシラーゼ産生遺伝子が、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するか、又は配列表の配列番号1に示す塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすると共にD-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものである請求の範囲第1項記載の形質転換微生物。
3. 亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を亜鉛耐性を示す宿主微生物に導入してなる形質転換微生物を、亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物からD-アミノアシラーゼを取得するD-アミノアシラーゼの製造方法。
4. 前記培地に含まれる亜鉛イオン濃度を0.1~10mMに制御する請求の範囲第3項記載のD-アミノアシラーゼの製造方法。

1/2

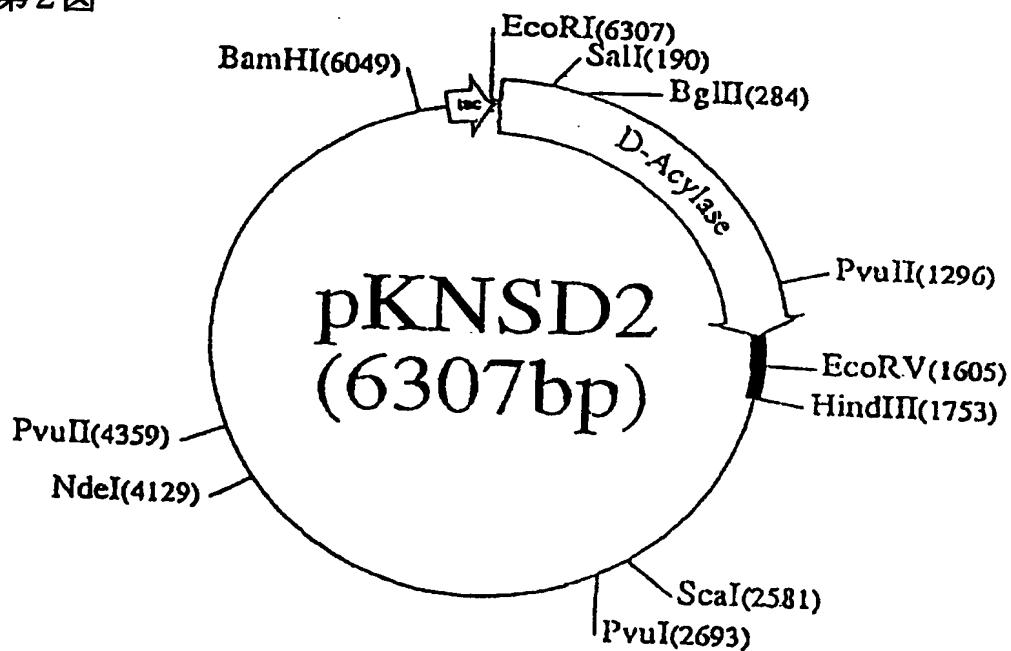
第1図



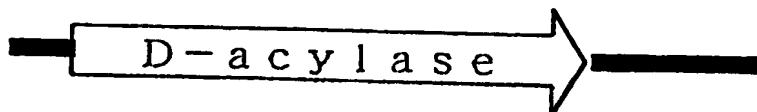
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/2

第2図



挿入断片：



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 5

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> Amano Pharmaceutical Co., Ltd

<120> 形質転換微生物、D-アミノアシラーゼの製造方法

<130> POK-99-022

<160> 1

<210> 1

<211> 1758

<212> DNA

<213> Alcaligenes xylosoxydans subsp. xylosoxydans

<400> 1

gaattccact tgatcgccga aggagagatt tcc atg tcc caa tcc gat tcc cag ccc 57

Met Ser Gln Ser Asp Ser Gln Pro

1 5

ttc gac ctg ctg ctc gcg ggc acc ctc atc gac ggc agc aac acc 105

Phe Asp Leu Leu Leu Ala Gly Gly Thr Leu Ile Asp Gly Ser Asn Thr

10 15 20

ccg ggg cgg cgc gcc gac ctg ggc gtg cgc ggc gac cgc atc gcc gcc 153

Pro Gly Arg Arg Ala Asp Leu Gly Val Arg Gly Asp Arg Ile Ala Ala

25 30 35 40

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 5

| | | |
|---|-----|-----|
| atc ggc gat ctg tcg gac gcc gcc gcg cac acc cgg gtc gac gtg tcg | | 201 |
| Ile Gly Asp Leu Ser Asp Ala Ala Ala His Thr Arg Val Asp Val Ser | | |
| 45 | 50 | 55 |
| ggc ctg gtg gtc gcg ccc ggc ttc atc gac tcg cac acc cac gac gac | | 249 |
| Gly Leu Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Asp Ser His Thr His Asp Asp | | |
| 60 | 65 | 70 |
| aac tac ctg ctc agg cgt cgc gac atg acg ccc aag atc tcg cag ggc | | 297 |
| Asn Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Met Thr Pro Lys Ile Ser Gln Gly | | |
| 75 | 80 | 85 |
| gtc acc acg gtg gtc acg ggc aat tgc ggc atc agc ctg gcg ccg ctg | | 345 |
| Val Thr Thr Val Val Thr Gly Asn Cys Gly Ile Ser Leu Ala Pro Leu | | |
| 90 | 95 | 100 |
| gcg cac gcc aac ccg ccc gcc ccc ctg gac ctg ctg gac gaa ggc ggc | | 393 |
| Ala His Ala Asn Pro Pro Ala Pro Leu Asp Leu Leu Asp Glu Gly Gly | | |
| 105 | 110 | 115 |
| tct tac cgt ttc gag cgc ttc gcc gac tac ctg gac gcg ttg cgg gcc | | 441 |
| Ser Tyr Arg Phe Glu Arg Phe Ala Asp Tyr Leu Asp Ala Leu Arg Ala | | |
| 125 | 130 | 135 |
| acg ccg gcg gcc gtc aac gcc gcc tgt atg gtg ggc cat tca acg ctg | | 489 |
| Thr Pro Ala Ala Val Asn Ala Ala Cys Met Val Gly His Ser Thr Leu | | |
| 140 | 145 | 150 |
| cgc gcc gcg gtc atg ccg gac ttg cag cgc gcc gcc acc gac gag gaa | | 537 |
| Arg Ala Ala Val Met Pro Asp Leu Gln Arg Ala Ala Thr Asp Glu Glu | | |
| 155 | 160 | 165 |
| atc gcg gcc atg cgg gac ctg gcc gag gaa gcc atg gcc agc ggc gcc | | 585 |
| Ile Ala Ala Met Arg Asp Leu Ala Glu Glu Ala Met Ala Ser Gly Ala | | |
| 170 | 175 | 180 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | | |
|---|-----|------|
| atc ggc att tcg acc ggc gcc ttc tac ccg ccc gcc gcc cgc gcc acc | | 633 |
| Ile Gly Ile Ser Thr Gly Ala Phe Tyr Pro Pro Ala Ala Arg Ala Thr | | |
| 185 | 190 | 195 |
| acc gaa gag atc atc gag gtg tgc cgg ccg ctg agc gcg cat ggc ggc | | 681 |
| Thr Glu Glu Ile Ile Glu Val Cys Arg Pro Leu Ser Ala His Gly Gly | | |
| 205 | 210 | 215 |
| atc tac gcc acc cac atg cgc gac gaa ggc gag cac atc gtg gcc gcg | | 729 |
| Ile Tyr Ala Thr His Met Arg Asp Glu Gly Glu His Ile Val Ala Ala | | |
| 220 | 225 | 230 |
| ctg gag gaa acc ttc cgc atc ggc cgc gag ctg gac gtg ccg gtg gtg | | 777 |
| Leu Glu Glu Thr Phe Arg Ile Gly Arg Glu Leu Asp Val Pro Val Val | | |
| 235 | 240 | 245 |
| atc tcg cac cac aag gtc atg ggc cag ccc aat ttc ggc cgc tcg cgc | | 825 |
| Ile Ser His His Lys Val Met Gly Gln Pro Asn Phe Gly Arg Ser Arg | | |
| 250 | 255 | 260 |
| gag acg ctg ccg ctg atc gag gcc gcc atg gcg cgc cag gac gtc tcg | | 873 |
| Glu Thr Leu Pro Leu Ile Glu Ala Ala Met Ala Arg Gln Asp Val Ser | | |
| 265 | 270 | 275 |
| ctg gac gcg tat ccc tac gtg gcc ggc tcc acc atg ctc aag cag gac | | 921 |
| Leu Asp Ala Tyr Pro Tyr Val Ala Gly Ser Thr Met Leu Lys Gln Asp | | |
| 285 | 290 | 295 |
| cgc gtg ctg ctg gcc gga cgc acc atc atc acc tgg tgc aag ccc ttc | | 969 |
| Arg Val Leu Leu Ala Gly Arg Thr Ile Ile Thr Trp Cys Lys Pro Phe | | |
| 300 | 305 | 310 |
| ccc gaa ctg agc ggg cgc gac ctg gat gaa gtc gcg gcc gag cgc ggc | | 1017 |
| Pro Glu Leu Ser Gly Arg Asp Leu Asp Glu Val Ala Ala Glu Arg Gly | | |
| 315 | 320 | 325 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 5

aaa tcc aag tac gac gtg gtg ccc gag ctg cag ccg gcc ggc gcc atc 1065
 Lys Ser Lys Tyr Asp Val Val Pro Glu Leu Gln Pro Ala Gly Ala Ile
 330 335 340
 tac ttc atg atg gac gaa ccc gac gtg cag cgc atc ctg gcg ttc ggc 1113
 Tyr Phe Met Met Asp Glu Pro Asp Val Gln Arg Ile Leu Ala Phe Gly
 345 350 355 360
 ccg acc atg atc ggc tcc gac ggc ctg ccg cac gac gag cgc ccg cat 1161
 Pro Thr Met Ile Gly Ser Asp Gly Leu Pro His Asp Glu Arg Pro His
 365 370 375
 ccg cgc ctg tgg ggc acc ttc ccg cgg gtg ctg ggg cac tat gcg cgc 1209
 Pro Arg Leu Trp Gly Thr Phe Pro Arg Val Leu Gly His Tyr Ala Arg
 380 385 390
 gac ctg ggc ctg ttc ccg ctg gag acg gcg gta tgg aag atg acc ggc 1257
 Asp Leu Gly Leu Phe Pro Leu Glu Thr Ala Val Trp Lys Met Thr Gly
 395 400 405
 ctg acc gcc gcg cgc ttc ggc ctg gcc ggg cgc ggg cag ctg cag gcc 1305
 Leu Thr Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ala Gly Arg Gly Gln Leu Gln Ala
 410 415 420
 ggg tac ttc gcc gac ctg gtg gtg ttc gac ccg gcc acg gtg gcc gat 1353
 Gly Tyr Phe Ala Asp Leu Val Val Phe Asp Pro Ala Thr Val Ala Asp
 425 430 435
 acc gcc acc ttc gaa cac cct acc gag cgc gcc ggc atc cat tcc 1401
 Thr Ala Thr Phe Glu His Pro Thr Glu Arg Ala Ala Gly Ile His Ser
 440 445 450 455
 gtg tac gtc aac ggc gcg ccg gtc tgg caa gag cag cgc ttc acc ggc 1449
 Val Tyr Val Asn Gly Ala Pro Val Trp Gln Glu Gln Ala Phe Thr Gly
 460 465 470

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 5

cag cat gcc ggc cgc gtg ctc gca cgc acg gcc gcc tg agcccgccgc 1497
Gln His Ala Gly Arg Val Leu Ala Arg Thr Ala Ala
475 480 483
cagcccttac aatccggcgt gaacggggcg gcgtgccgcc ccctcccaac cctggacgca 1557
aaccgctaca tggccccctcc ctccgctcgc aatacggccc cacccgatat cgtggcaag 1617
gaagtgtatgg ggcgcgcgcct ggcgcgcgag cgcaaggccc ggaaaatgac cctgcaagac 1677
ctgtcgcagg ccagcggcat cgccgtctcg accctgtcca aggccgagct gggccagatc 1737
gccctgagct acgagaagct t 1758

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Wakayama, M. et al., "Purification and characterization of L-aminoacylase from <i>Pseudomonas maltophilia</i> B1", Journal of Fermentation and Bioengineering (1998), Vol.85, No.3, pp.278-282 | 1-4 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 and expression of the gene in <i>Escherichia coli</i> ", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (1995), Vol.59, No.11, p.2115-2119 | 1-4 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Overproduction of D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 in <i>Escherichia coli</i> and its purification", Protein Expression and Purification (1996), Vol.7, No.4, pp.395-399 | 1-4 |
| P,X | Farah, J-M. et al., "Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase", Biochemistry (February 2000), Vol.39, No.6, pp.1285-1293 | 1-4 |
| P,A | Wakayama, M. et al., "Role of conserved histidine residues | 1-4 |

| | | | |
|---|--|--|--------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input type="checkbox"/> | See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents: | | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 12 September, 2000 (12.09.00) | Date of mailing of the international search report 19 September, 2000 (19.09.00) |
|--|---|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03932

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim N . |
|-----------|---|-----------------------|
| A | in D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (January 2000), Vol.64, No.1, pp.1-8 | |
| A | JP, 62-163689, A (Nagase Seikagaku Kogyo K.K.), 20 July, 1987 (20.07.87) (Family: none) | 1-4 |
| A | WO, 90/02177, A (AMGEN et al.), 08 March, 1990 (08.03.90) & EP, 394393, A & US, 5484728, A & US, 5589386, A & JP, 3-501086, A | 1-4 |

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリーエ | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | Wakayama, M. et al., "Purification and characterization of L-aminoacylase from <i>Pseudomonas maltophilia</i> B1", Journal of Fermentation and Bioengineering (1998), Vol. 85, No. 3, p. 278-282 | 1-4 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 and expression of the gene in <i>Escherichia coli</i> ", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (1995), Vol. 59, No. 11, p. 2115-2119 | 1-4 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

六笠 紀子

印 4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Overproduction of D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 in <i>Escherichia coli</i> and its purification", Protein Expression and Purification (1996) , Vol. 7 , No. 4 , p. 395-399 | 1 - 4 |
| P, X | Farah, J-M. et al., "Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase" , Biochemistry (Feb. 2000) , Vol. 39 , No. 6 , p. 1285-1293 | 1 - 4 |
| P, A | Wakayama, M. et al., "Role of conserved histidine residues in D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6" , Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Jan. 2000) , Vol. 64 , No. 1 , p. 1-8 | 1 - 4 |
| A | JP, 62-163689, A (ナガセ生化学工業株式会社) 20. 7月. 1987 (20. 07. 87) ファミリーなし | 1 - 4 |
| A | WO, 90/02177, A (AMGEN et al.) 8. 3月. 1990 (08. 03. 90) & EP, 394393, A & US, 5484728, A & US, 5589386, A & JP, 3-501086, A | 1 - 4 |

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

REC'D 10 SEP 2001

WIPO

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT 36条及びPCT規則70]

| | | |
|---|---|---------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 I POKO 0 - 0 1 OWO | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO 0 / 0 3 9 3 2 | 国際出願日 (日.月.年) 15. 06. 00 | 優先日 (日.月.年) 17. 06. 99 |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N 1/21, 15/52, 9/80 | | |
| 出願人（氏名又は名称） 天野エンザイム株式会社 | | |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT 36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

| | |
|---|--|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 28. 12. 00 | 国際予備審査報告を作成した日 23. 08. 01 |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官（権限のある職員） 本間 夏子  電話番号 03-3581-1101 内線 3488 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際予備審査報告

国際出願番号 PCT/JP00/03932

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

| | | |
|--------------------------------------|------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

| | | |
|--|----|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| 請求の範囲 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 請求の範囲 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

| | | |
|-------------------------------------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| 図面 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 図面 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

| | | |
|---|------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

| | |
|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | この国際出願に含まれる書面による配列表 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表 |
| <input type="checkbox"/> | 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表 |
| <input type="checkbox"/> | 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表 |
| <input type="checkbox"/> | 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。 |

4. 補正により、下記の書類が削除された。

| | |
|--|-------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ | ページ |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ | 項 |
| <input type="checkbox"/> 図面 図面の第 _____ | ページ/図 |

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

| | | |
|-------|-------|---|
| 請求の範囲 | 1 - 4 | 有 |
| 請求の範囲 | | 無 |

進歩性 (I S)

| | | |
|-------|-------|---|
| 請求の範囲 | | 有 |
| 請求の範囲 | 1 - 4 | 無 |

産業上の利用可能性 (I A)

| | | |
|-------|-------|---|
| 請求の範囲 | 1 - 4 | 有 |
| 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : J. Ferment. Bioeng., Vol. 85, No. 3 (1998) p. 278-282

文献2 : Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 59, No. 11 (1995) p. 2115-2119

請求の範囲 1 - 4

請求の範囲 1 - 4 に係る発明は、国際調査報告に引用された上記文献1及び2により進歩性を有しない。

文献1には、*Pseudomonas maltophilia* B1由来のアミノアシラーゼの活性が亜鉛イオンにより活性化されることが記載されている（文献1：第278頁Abstract第8行目）。

文献2には、*Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6由来のアミノアシラーゼのアミノ酸配列及び遺伝子配列が記載されている（文献2：第2117頁Fig. 3）。

ここで、本願請求の範囲1において、亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を宿主微生物に導入することが記載されているが、明細書の実施例において亜鉛の存在下で測定しているのは酵素活性であるから、発現が増加しているかどうかは不明である。

よって、文献2に記載されたアミノアシラーゼをコードする遺伝子を宿主微生物に導入し、亜鉛イオンの存在下で培養することで文献1に記載されたように亜鉛イオンによりアミノアシラーゼ活性の高いものを得ることは当業者が容易に想到し得たものと認められ、このようにして得られたものと本願発明は区別できない。

また、この際に亜鉛イオンの存在下で培養することを想定して、宿主微生物として亜鉛イオンに耐性のものを選択することは当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

したがって、請求の範囲1 - 4 に係る発明は、文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P · U S

特許協力条約

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[P C T 18条、P C T 規則43、44]

| | | |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 I P O K 0 0 - 0 1 0 W O | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 3 9 3 2 | 国際出願日 (日.月.年) 15.06.00 | 優先日 (日.月.年) 17.06.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 天野製薬株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
 - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
 - b. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
 出願人が提出したものと承認する。
 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は
 出願人が提出したものと承認する。
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし
 出願人は図を示さなかった。
 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N 1/21, C12N 15/52, C12N 9/80

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | Wakayama, M. et al., "Purification and characterization of L-aminoacylase from <i>Pseudomonas maltophilia</i> Bl", Journal of Fermentation and Bioengineering (1998), Vol. 85, No. 3, p. 278-282 | 1-4 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 and expression of the gene in <i>Escherichia coli</i> ", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (1995), Vol. 59, No. 11, p. 2115-2119 | 1-4 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

六笠 紀子

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Wakayama, M. et al., "Overproduction of D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6 in <i>Escherichia coli</i> and its purification", Protein Expression and Purification (1996), Vol. 7, No. 4, p. 395-399 | 1-4 |
| P, X | Farah, J-M. et al., "Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase", Biochemistry (Feb. 2000), Vol. 39, No. 6, p. 1285-1293 | 1-4 |
| P, A | Wakayama, M. et al., "Role of conserved histidine residues in D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Jan. 2000), Vol. 64, No. 1, p. 1-8 | 1-4 |
| A | JP, 62-163689, A (ナガセ生化学工業株式会社) 20.7月.1987 (20.07.87) ファミリーなし | 1-4 |
| A | WO, 90/02177, A (AMGEN et al.) & EP, 394393, A & US, 5484728, A & US, 5589386, A & JP, 3-501086, A 8.3月.1990 (08.03.90) | 1-4 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47
Translation

101009782
PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

JUN 27 2002

TECH CENTER 1600/2900

| | | |
|---|--|---|
| Applicant's or agent's file reference IPOK00-010WO | FOR FURTHER ACTION | See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |
| International application No. PCT/JP00/03932 | International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00) | Priority date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/21, 15/52, 9/80 | | |
| Applicant AMANO ENZYME INC. | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 28 December 2000 (28.12.00) | Date of completion of this report 23 August 2001 (23.08.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03932

I. Basis of the report1. With regard to the **elements** of the international application:* the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03932

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-4 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-4 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-4 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1: J. Ferment. Bioeng., (1998), Vol. 85, No. 3, pages 278-282

Document 2: Biosci. Biotech. Biochem., (1995), Vol. 59, No. 11, pages 2115-2119

Claims 1-4

The subject matters of claims 1-4 do not appear to involve an inventive step in view of documents 1 and 2 respectively cited in the ISR.

Document 1 describes that zinc ions activate the activity of aminoacylase derived from *Pseudomonas maltophilia* B1 (Document 1: Page 278, Abstract, Line 8).

Document 2 describes an amino acid sequence and a gene sequence of the aminoacylase derived from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 (Document 2: Page 2117, Fig. 3).

Claim 1 of the present application describes that a D-aminoacylase producing gene intensified in the expression of a gene product due to the presence of zinc ions is introduced into a host microbe, but since enzyme activity is determined in the presence of zinc in the examples of the specification, whether or not the expression increased is unknown.

So, a person skilled in the art could have easily conceived of obtaining aminoacylase with high activity using zinc ions as described in document 1, by introducing the gene encoding aminoacylase described in document 2 into a host microbe and culturing in the presence of zinc ions, and the aminoacylase obtained like this cannot be distinguished from the invention of the present application.

Furthermore, in this case, a person skilled in the art could have selected a host microbe tolerant to zinc ions, as required, in anticipation of culturing in the presence of zinc ions.

So, a person skilled in the art could have easily achieved the subject matters of claims 1-4 based on the descriptions of documents 1 and 2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)